Trousse pour la détermination radioimmunologique de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) / (tubes revêtus, spécificité β)

Contenu de la trousse :

- 1 flacon de **^{125}I-Anti-α-hCG** (monoclonal souris), < 300 kBq, 22 ml de tampon contenant de l'albumine bovine, du sérum de rat, de l'azoture de sodium et un colorant rouge.
- 2 x 50 **tubes revêtus d'anticorps** anti-β-hCG (monoclonal, souris).
- 8 flacons de **standards** d'hCG, lyophilisés, qsp 0,5 ml d'eau distillée. Sérum humain et azoture de sodium, concentration allant de 0 à 1000 mUI hCG/ml.
- 1 flacon de **sérum de contrôle** d' hCG, lyophilisé, qsp 0,5 ml d'eau distillée. Sérum humain et azoture de sodium, concentration indiquée sur l'étiquette.
- 1 flacon de **tampon d'incubation**, contenant 50 ml de tampon, de l'albumine bovine, de l'azoture de sodium et un colorant bleu.
- 1 **réactif de lavage,** 5 comprimés sous blister.
- 1 sachet plastique.
- 1 mode d'emploi.

Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. Eviter toute absorption des réactifs ainsi que tout contact avec la peau ou les muqueuses. L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azotures de métaux fortements explosifs. Les diluer abondamment lors de l'évacuation des déchets.

1. Introduction

La gonadotrophine chorionique humaine (hCG), qui se compose de 237 acides aminés et d'environ 30 % de glucides (poids moléculaire environ 40000), renferme, comme les autres hormones glycoprotéiques hLH, hFSH et hTSH, deux sous-unités (α et β) liées entre elles de façon non covalente, seule la molécule totale (hCG) étant biologiquement active. Du point de vue structure, elle s'apparente le plus à la hLH qui possède 3 acides aminés de moins dans la chaîne α et 30 de moins dans la chaîne β. L'identité de plusieurs séquences partielles entraîne un comportement analogue du point de vue liaison aux récepteurs et aux anticorps. De même, l'action physiologique de l'hCG s'apparente à celle de l'hLH ; au début de la grossesse, la fonction du corps jaune est stimulée, ainsi que la synthèse et la sécrétion des stéroïdes placentaires.

2. Résultats cliniques obtenus avec le RIA-gnost® hCG

2.1. Importance clinique du dosage de l'hCG

L'hCG n'est normalement pas détectable dans le sérum des femmes non enceintes et des hommes. Le taux d'hCG augmente par contre rapidement dans les 2 semaines qui suivent la conception (3 à 4 semaines après la dernière menstruation) et il atteint son maximum au cours du 2ème et du 3ème mois.
Il s'abaisse à nouveau nettement pendant le 2ème et le 3ème trimestre, des différences importantes pouvant être enregistrées pour certains cas particuliers. Après la naissance, le taux d'hCG se situe à nouveau en dessous du seuil de détection avec une demi-vie de 24 à 36 heures.
Des taux supérieurs à la normale font suspecter une grossesse multiple, tandis que des taux d'hCG trop bas s'observent en cas de grossesses perturbées (par exemple grossesse ectopique, menace d'avortement).
Des concentrations d'hCG pathologiquement élevées sont détectées en cas de tumeurs trophoblastiques et, souvent aussi, en cas de tumeurs non trophoblastiques.
Il en ressort que l'emploi clinique du dosage de l'hCG en gynécologie et en oncologie a pour but la détection et le suivi des grossesses et des affections tumorales.

2.2. Taux normaux

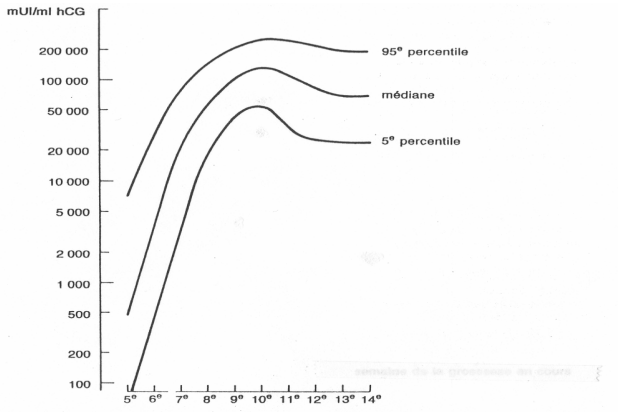
2.2.1 Diagnostic des tumeurs

La limite supérieure de la plage normale a été établie à l'aide de 165 échantillons de sérums d'hommes sains et de 96 échantillons de sérums de femmes non enceintes au moyen du 95e percentile. Chez les femmes avant la ménopause et chez les hommes, la limite supérieure s'élève à 5 mUI/ml hCG, tandis que ce taux passe à 10mUI/ml hCG (n = 157) chez les femmes après la ménopause.
Les taux sériques d'hCG dépassant cette limite peuvent servir d'indicateur tumoral. Le marqueur tumoral hCG convient particulièrement à la surveillance des tumeurs productrices d'hCG.

2.2.2. Grossesse

La plage normale a été établie pour le RIA-gnost® hCG par la mesure de 329 sérums de femmes dont la grossesse se déroulait normalement et prélevés entre la 5e et la 14e semaine de grossesse en cours. Cette plage a été calculée au moyen de la médiane (50e percentile), ainsi que du 5e et du 95e percentile (cf. Fig.1 et Tabl.1).

Fig. 1 : Plage normale de la concentration d'hCG dans le sérum de femmes en début de grossesse.



Tabl. 1 : Plage normale de la concentration d'hCG dans le sérum de femmes pendant la grossesse.

Semaine de la grossesse en cours	Nombre n	Médiane (mUI/ml hCG)	Plage (mUI/ml hCG)
Non enceintes	96	0	< 10
5	42	480	60 - 7 100
5-6	105	2 300	110 - 16 200
6-7	115	8 400	530 - 62 200
7-8	81	30 700	3 000 - 130 000
8-9	69	82 700	17 800 - 207 400
9-10	69	121 500	30 600 - 254 600
10-11	53	121 600	34 400 - 244 800
11-12	46	97 300	29 100 - 213 300
12-13	35	67 650	25 900 - 208 400
13-14	28	71 100	30 600 - 189 000
2ème trimestre	92	27 500	10 100 - 92 200
3ème trimestre	34	15 200	3 360 - 43 500

3. Principe de mesure et caractéristiques du RIA-gnost® hCG

3.1. Principe

Le RIA-gnost® hCG permet le dosage sérique in vitro de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) totale et biologiquement active selon le principe d'un test « sandwich ». Cette technique nécessite la présence d'anticorps monoclonaux anti-β-hCG, immobilisés sur la paroi interne de la partie inférieure du tube à essai. Après addition des standards et des échantillons de patients, l'hCG se fixe pendant la première incubation sur la paroi du tube par l'intermédiaire des anticorps de la phase solide. Après élimination du sérum et de l'antigène en excès, l'hCG présente est dosée, au cours de la 2ème incubation, au moyen de la liaison d'un anticorps anti-α-hCG monoclonal marqué à l'iode 125.

Etant donné que les taux d'hCG que l'on peut escompter physiologiquement pendant la grossesse dépassent 200 000 mUI/ml mais que, par ailleurs, une plus grande sensibilité est exigée pour la détection précoce d'une grossesse et le diagnostic de tumeurs, on a associé dans le RIA-gnost hCG une plage de mesure étendue (0 à 1000 mUI d'hCG/ml) à une sensibilité élevée (< 1 mUI d'hCG/ml) ; variance de S_0). Dans le présent essai, le rapport signal/concentration est net dans toute la plage de mesure (pas d'effet crochet).

La **standardisation** du RIA-gnost® hCG a été réalisée à l'aide du 1st IRP (OMS 75/537) en mUI/ml. Etant donné que seule l'hCG totale est mesurée en méthode IRMA, on obtient des valeurs identiques même en cas de calibration au moyen du 2ème IS (étalon international de L'OMS 61/6 de 1963) contaminé par des sous-unités.

3.2. Imprécision

Elle a été évaluée à l'aide de 3 échantillons dosés 10 fois dans la même série et dans 22 séries différentes.

Intra-essai

Echantillons	Moyenne (mUI/ml)	CV (%)
1	12,9	2,4
2	50	2,8
3	90	1,8

Inter-essai

Echantillons	Moyenne (mUI/ml)	CV (%)
4	11,7	11,4
5	22	8,7
6	149	3,8

4. Mode d'emploi

4.1. Matériel nécessaire

Micropipettes de précision ou matériel similaire à embouts jetables permettant la distribution de 20 µl, 50 µl, 100 et 200 µl (± 1 %). Leur calibration doit être vérifiée régulièrement. Distributeur de 1 ml. Eprouvettes graduées. Agitateur horizontal. Compteur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125.

4.2. Préparation des réactifs

Les réactifs conservés entre +2 et +8°C sont prêts à l'emploi lorsqu'ils ont atteint une température comprise entre 18 et 25°C. Les réactifs lyophilisés (standards et contrôle) doivent être dissous dans 0,5 ml d'eau distillée. Après reconstitution, ils sont utilisables pendant 4 heures à température ambiante (18-25°C). Ensuite, ils peuvent être conservés pendant 15 jours à 2-8°C ou 45 jours sous forme congelée. Ils peuvent être congelés, décongelés une fois. Les 5 comprimés tampon de lavage doivent être dissous dans 500 ml d'eau distillée.

Remarques

Les réactifs de différentes trousses d'un même lot peuvent être rassemblés si l'on veut effectuer une série assez importante. Conserver les tubes non utilisés dans la boîte refermée entre +2 et +8°C.

Les tubes revêtus d'anticorps sortis de leur emballage et non utilisés doivent être stockés dans le sachet plastique fourni dans la trousse.

4.3. Préparation des échantillons

Après le prélèvement sanguin, préparer le sérum ou le plasma selon le procédé habituel. Le sérum ou le plasma peut être utilisé immédiatement pour le test ou conservé pendant 24 heures au maximum entre +2 et +8°C. Pour une conserva tion plus longue, une température de –20°C est recommandée. Après décongél ation, bien agiter les échantillons. Les sérums dont le taux d'hCG est supérieur à celui de la plage de mesure doivent être dilués. La trousse renferme un tampon d'incubation qui est employé non

seulement comme milieu d'incubation mais aussi comme agent de dilution. Si l'agent de dilution ne suffit pas, préparer la 1ère dilution des hautes dilutions à l'aide du tampon de lavage. Pour le suivi des grossesses, utiliser une dilution au 1/20 ainsi qu'au 1/200. Bien homogénéiser lorsqu'on opère les dilutions. On peut également utiliser des échantillons d'urine pour le dosage qualitatif.

4.4. Mises en garde et précautions d'emploi

Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousses agréées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.

4.5. Protocoles de dosage

Il convient de faire la distinction entre le dosage qualitatif destiné à la détection précoce d'une grossesse et le dosage quantitatif servant à contrôler l'évolution de la grossesse et à établir le diagnostic de tumeurs.

4.5.1. Dosage qualitatif

1. Numéroter un nombre suffisant de tubes revêtus d'anticorps comme indiqué dans le tableau 2 (1 témoin négatif = S_0, 1 témoin positif = sérum de contrôle, 1 standard de référence = S_3 au maximum 47 échantillons inconnus).
2. Distribuer 100 µl des standards et des échantillons de patients au fond des tubes préparés à cet effet. Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.
3. Distribuer dans chaque tube 100 µl de solution du tampon d'incubation.
4. Agiter les tubes sur un agitateur horizontal pendant 10 à 30 minutes et entre 18 et 25°C.
5. Distribuer dans chaque tube 1 ml de tampon de lavage à l'aide d'un distributeur, décanter (aspirer), puis rincer avec 1 ml.
6. Distribuer ensuite 200 µl de solution de traceur au fond de chaque tube.
7. Agiter pendant 10 à 60 minutes comme indiqué en 4.1.
8. Laver comme indiqué en 4.2.
9. Mesurer la radioactivité des tubes pendant 1 minute à l'aide d'un compteur gamma.

Tabl. 2 : Réalisation du dosage qualitatif de l'hCG

	Témoin négatif (S_0) (µl)		**Témoin positif (Sérum de contrôle) (µl)**		**Standard de référence (S_3) (µl)**		**Echantillons (sérum ou urine) (µl)**				
Numérotation des tubes ►	S_0		C		S_3		1		2		etc
Témoin négatif (S_0)	100	100									
Témoin positif C (Sérum de contrôle)			100	100							
Standard de référence (S_3)					100	100					
Echant. Sérum (urine) 1							100	100			
Echant. Sérum (urine) 2 etc.									100	100	etc.
Tampon d'incubation	◄----------100 µl ----------►										
	Agiter pendant 10 à 30 min										
Tampon de lavage	◄----------1 ml ----------►										
	Décanter (aspirer) ; laver avec 1 ml										
Traceur anti-α-hCG	◄----------200 µl ----------►										
	Agiter pendant 10 à 60 min										
Tampon de lavage	◄----------1 ml ----------►										
	Décanter (aspirer) ; laver avec 1 ml										
	Compter										

Lecture des résultats du dosage qualitatif

1. Etablir les moyennes des cpm des échantillons de patients et des échantillons témoin mesurés en double (témoin nég./pos., standard de référence).
2. Le nombre de cpm du témoin négatif (S_0) doit être significativement inférieur à celui du standard de référence (S_3), lequel doit être inférieur à celui du témoin positif (sérum de contrôle) nettement supérieur.
3. Les échantillons dont le nombre de cpm est significativement supérieur à celui du standard de référence seront considérés comme positifs. Si l'on enregistre un nombre de cpm situé à la limite de la plage, effectuer à nouveau un prélèvement 48 heures après et contrôler le résultat en procédant à une nouvelle mesure (cf. Tabl. 3).

Les échantillons dont le nombre de cpm est significativement inférieur à celui du standard de référence seront considérés comme négatifs.

Tabl. 3 : Exemple de lecture des résultats du dosage qualitatif de l'hCG.

	Moyenne (cpm)	Résultats
Standard de référence (S_3)	1 128	-
Témoin négatif (S_0)	120	-
Témoin positif (sérum de contrôle)	2 584	-
Echantillon 1	167	négatif
Echantillon 2	2 192	positif
Echantillon 3	140	négatif
Echantillon 4	1 070	valeur limite

4.5.2. Dosage quantitatif

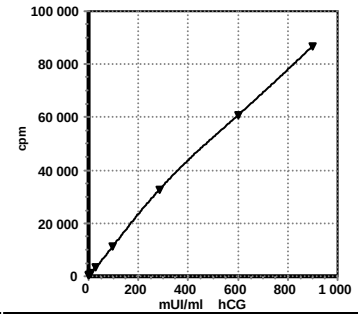
1. Numéroter un nombre suffisant de tubes revêtus d'anticorps comme indiqué dans le Tabl. 4 (S_0 à S_7 ; sérum de contrôle, échantillons inconnus). Il est recommandé d'effectuer l'essai en double.
2. Distribuer 100 µl des standards et des échantillons de patients (sérum ou dilutions tampon [bleu] au fond des tubes préparés à cet effet. Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.
3. Distribuer dans chaque tube 100 µl de solution de tampon d'incubation.
4. Agiter les tubes sur un agitateur horizontal pendant 30 minutes entre 18 et 25°C.
5. Distribuer avec un distributeur 1 ml de tampon de lavage dans chaque tube, décanter (aspirer) et rincer avec 1 ml.
6. Distribuer 200 µl de solution de traceur au fond de chaque tube.
7. Agiter pendant 60 minutes comme indiqué en 4.
8. Laver comme indiqué en 5.
9. Mesurer la radioactivité des tubes pendant 1 minute à l'aide d'un compteur gamma.

Lecture des résultats du dosage quantitatif

Après avoir mesuré la radioactivité exprimée en coups par minute (cpm) de tous les standards S0 à S7, porter les résultats sur une feuille préparée à cet effet en fonction de la concentration d'hCG correspondante (cf. fig. 2, exemple d'une courbe d'étalonnage). Construire la courbe étalon en reliant les points, sauf ceux qui indiquent des taux de comptage présentant de forts écarts. On peut encore agrandir l'échelle à la base de la courbe en vue de faciliter la lecture de très faibles concentrations d'hCG. Etablir la moyenne des valeurs (cpm) obtenues pour les sérums de patients et le sérum de contrôle, puis lire leur concentration en hCG à partir de la courbe d'étalonnage.

Fig.2 : Exemple d'une courbe d'étalonnage

Groupes de tubes	cpm moyens	Concentration mUI/ml
Standard 0	176	0
Standard 1	543	3,6
Standard 2	1246	9,0
Standard 3	3346	28,5
Standard 4	11168	97,0
Standard 5	32766	285,0
Standard 6	69704	600,0
Standard 7	86786	900,0
Contrôle	14017	122



Tab. 4 : Réalisation du dosage quantitatif de l'hCG

	Standards (µl)								Sérum de contrôle (µl)	Echantillons (µl)		
N°des tubes	**S_0**	**S_1**	**S_2**	**S_3**	**S_4**	**S_5**	**S_6**	**S_7**	**C**	**1**	**2**	**etc**
Standards S_0	100/100											
S_1		100/100										
S_2			100/100									
S_3				100/100								
S_4					100/100							
S_5						100/100						
S_6							100/100					
S_7								100/100				
Sérum de contrôle									100/100			
Echantillons										100	100	etc.
Tampon d'incubation	◄----------100 µl ----------►											
	Agiter pendant 30 minutes											
Tampon de lavage	◄----------1 ml ----------►											
	Décanter (aspirer) ; rincer avec 1 ml											
Traceur anti-α-hCG	◄----------200 µl ----------►											
	Agiter pendant 60 minutes											
Tampon de lavage	◄----------1 ml ----------►											
	Décanter (aspirer) ; rincer avec 1 ml											
	Compter											

5. Règles de base de radioprotection

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires couverts par cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée ni à l'homme ni aux animaux.
L'achat, la détention, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.
L'application des règles de base de radioprotection assure une sécurité adéquate.
Un aperçu en est donné ci-dessous :
Les produits radioactifs seront stockés dans leur conteneur d'origine dans un local approprié.
Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
La manipulation de produits radioactifs se fera dans un local approprié dont l'accès doit être réglementé (zone contrôlée).
Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques en zone contrôlée.
Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
Toute élimination de déchets radioactifs se fera conformément aux réglementations en vigueur.